

**Fluorimeter for ion concn. measurement - has diffraction grating displaced by scanner for simultaneous or rapid sequential prodn. of different excitation wavelengths**

Veröffentlichungsnummer DE4228366

Veröffentlichungsdatum: 1994-03-03

Erfinder UHL RAINER DR (DE)

Anmelder: UHL RAINER DR (DE)

Klassifikation:

- Internationale: G01J3/44; G01J3/02; G01J3/18; G01J3/44; G01J3/00; G01J3/12; (IPC1-7): G01J1/00; G01J4/00; G01N21/54; G01N21/45

- Europäische: G01J3/44B

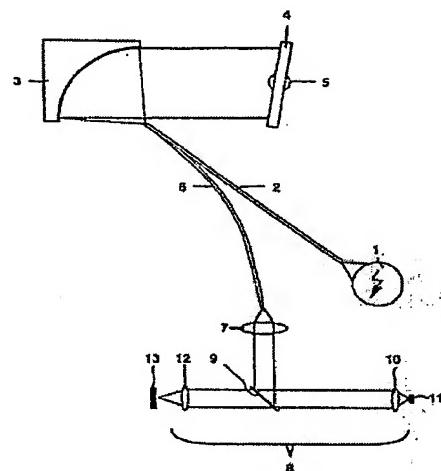
Anmeldenummer: DE19924228366 19920826

Prioritätsnummer(n): DE19924228366 19920826

Datenfehler hier melden

**Zusammenfassung von DE4228366**

A fluorescence measuring appts. for determining ion concns. in a test object, has a diffraction grating which is illuminated such that light with several different pre-selectable excitation wavelengths impinges, simultaneously or at short intervals, on the test object which is coloured with one or more fluorescent dyes having absorption and thus fluorescence characteristics varying according to the ion concn., a detector unit converting the resulting fluorescent light into a measurement signal. The novelty is that the illumination device has a single light source (1) and that the diffraction grating is a holographic volumetric grating(4) which is displaced by a scanner (5) to produce the different excitation wavelengths. In a second similar fluorescence measuring appts., the novelty is that the illumination device has a single light source and that the diffraction grating is a plane reflection grating receiving light, from the source, reflected from a plane mirror which is displaced by a scanner to produce the different excitation wavelengths. In a fluorescence measuring appts., esp. as above, the test object is excited with light of two different excitation wavelengths, simultaneously but with different polarisation directions. USE/ADVANTAGE - E.g. for measuring ion concns. (e.g. Ca, Mg,K and Cl) in cell cultures and for measuring and monitoring the effect of ions (e.g. Ca) or cell-active substances (e.g. ATP or cyclic nucleotides released during photolysis of cage cpds. The appts. has a simple construction and allows measurements to be carried out extremely rapidly and reliably at several wavelengths either simultaneously or at intervals of e.g. a few millisecs.



Daten sind von der [esp@cenet](mailto:esp@cenet) Datenbank verfügbar - Worldwide



(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

# Offenlegungsschrift

(10) DE 42 28 366 A 1

(51) Int. Cl. 5:

G 01 N 21/64

G 01 N 21/45

// G 01 J 1/00, 4/00

DE 42 28 366 A 1

- (21) Aktenzeichen: P 42 28 366.3
- (22) Anmeldetag: 26. 8. 92
- (23) Offenlegungstag: 3. 3. 94

(71) Anmelder:

Uhl, Rainer, Dr., 82166 Gräfelfing, DE

(74) Vertreter:

Möbus, R., Dipl.-Ing.; Möbus, D., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.,  
72762 Reutlingen; Schwan, G., Dipl.-Ing.,  
Pat.-Anwälte, 81739 München

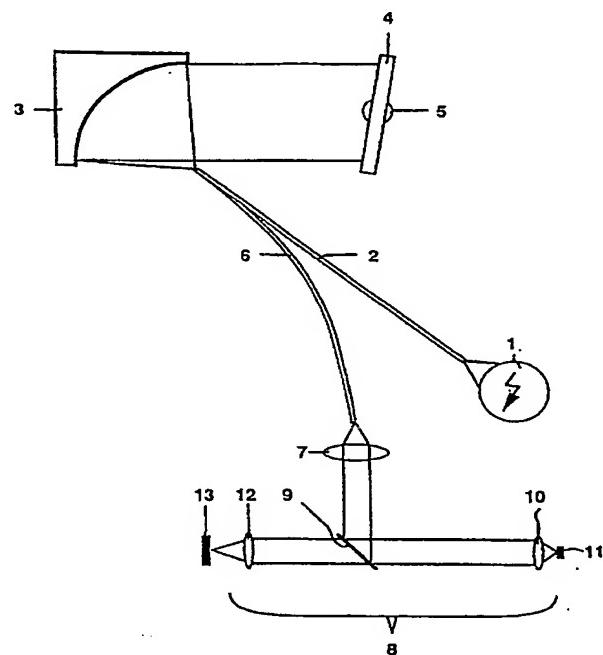
(72) Erfinder:

gleich Anmelder

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) Fluoreszenz-Meßvorrichtung

(57) Fluoreszenz-Meßvorrichtung zum Bestimmen von Ionenkonzentrationen in einem Untersuchungsobjekt, mit einer Beleuchtungsvorrichtung, einem Beugungsgitter, das so beleuchtet wird, daß es Licht mit mindestens zwei unterschiedlichen, vorwählbaren Anregungswellenlängen auf das Untersuchungsobjekt auftreffen läßt, das mit mindestens einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt ist, dessen Absorptions- und somit Fluoreszenzeigenschaften sich in Abhängigkeit von der zu bestimmenden Ionenkonzentration ändern, und mit einer Detektoreinheit zum Umwandeln des resultierenden Fluoreszenzlichts in ein Meßsignal. Die Beleuchtungsvorrichtung weist eine einzige Lichtquelle auf, und als Beugungsgitter ist ein holographisches Volumengitter vorgesehen, das zwecks Erzeugung der unterschiedlichen Anregungswellenlängen mittels eines Scanners verstellt wird. Die Meßvorrichtung kann derart ausgelegt sein, daß das Untersuchungsobjekt mit den beiden unterschiedlichen Wellenlängen gleichzeitig, aber mit unterschiedlicher Polarisationsrichtung angeregt wird.



DE 42 28 366 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 01. 94 308 069/170

7/48

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Fluoreszenz-Meßvorrichtung zur Bestimmung von Ionenkonzentrationen in einem Untersuchungsobjekt, mit einer Beleuchtungsvorrichtung, einem Beugungsgitter, das so beleuchtet wird, daß es Licht mit mehreren unterschiedlichen Anregungswellenlängen entweder in kurzem zeitlichem Abstand oder gleichzeitig auf das Untersuchungsobjekt auftreffen läßt, das mit einem oder mehreren Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt ist, deren Absorptionseigenschaften sich in Abhängigkeit von der zu bestimmenden Ionenkonzentration ändert, und mit einer Detektoreinheit, welche das resultierende Fluoreszenzlicht in ein Meßsignal umwandelt.

Eine Meßvorrichtung dieser Art ist in der DE-Patentanmeldung P 41 15 401.0 beschrieben und gehört zum Stand der Technik im Sinne des § 3 Abs. 2 PatG. Bei dieser früher vorgeschlagenen Fluoreszenz-Meßvorrichtung umfaßt die Beleuchtungsvorrichtung zwei Beleuchtungseinheiten, die jeweils eine Lichtquelle aufweisen und von denen mindestens eine gepulst ist. Dabei wird das Beugungsgitter von den beiden Beleuchtungseinheiten so beleuchtet, daß es in einer Austrittsspalt ebene die beiden von den Beleuchtungseinheiten ausgehenden Strahlengänge vereinigt und dort unter Bildung eines bichromatischen Intensitätszeitprofils unterschiedliche Wellenlängen auftreten läßt, je nachdem, welche der beiden Beleuchtungseinheiten gerade Licht abgibt. Zu jeder der beiden Beleuchtungseinheiten gehört ferner jeweils ein Lichtleiter, dessen Eintrittsöffnung über ein abbildendes System mit Licht von der zugeordneten Lichtquelle beaufschlagt wird und dessen Austrittsöffnung in einer Eintrittsspaltebene des als "Flat Field"-Gitters ausgebildeten Beugungsgitters liegt. Dabei erfolgt die Wellenlängenselektion durch Linearbewegung der Austrittsöffnungen der Lichtleiter in der Eintrittsspaltebene des Flat Field-Gitters. Diese Linearbewegung kann aber auch mit den schnellsten bekannten Verstellmotoren nicht so schnell vorgenommen werden, daß eine bichromatische Anregung mit ausreichender Zeitauflösung möglich wird. Die früher vorgeschlagene Fluoreszenz-Meßvorrichtung benötigt daher zwei Beleuchtungseinheiten aus Lichtquelle und Lichtleiter.

Eine zweite, schon seit langem in Monochromatoren eingesetzte Form der Wellenlängenselektion ist die durch Drehung des Beugungsgitters. Auch eine solche Drehung kann aber mit bekannten Technologien nicht so schnell durchgeführt werden, daß man mit einer Lichtquelle auskommen könnte.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Fluoreszenz-Meßvorrichtung zu schaffen, die sich durch einen besonders einfachen Aufbau auszeichnet und die es erlaubt, die gewünschten Messungen besonders rasch und zuverlässig durchzuführen, d. h. bei mehreren Wellenlängen entweder gleichzeitig oder mit einem zeitlichen Abstand von z. B. wenigen Millisekunden anzuregen.

Erfindungsgemäß weist bei einer Fluoreszenz-Meßvorrichtung der eingangs genannten Art die Beleuchtungsvorrichtung nur eine einzige Lichtquelle auf, und als Beugungsgitter ist ein holographisches Volumengitter vorgesehen, das zwecks Erzeugung der unterschiedlichen Anregungswellenlängen mittels eines Scanners verstellt wird.

Bei den vorliegend eingesetzten Volumengittern werden mittels einer holographischen Methode Brechungs-

indexvariationen in einem insbesondere aus Gelatine bestehenden Film erzeugt, so daß Braggsche Beugungsphänomene auftreten. Solche Volumengitter lassen sich so dünn und klein fertigen, daß sie unter Einsatz etablierter Scanner-Technologien rechnergesteuert mit der vorliegend nötigen Geschwindigkeit und Genauigkeit gedreht werden können. Es wird auf diese Weise möglich, in kürzester Zeit, beispielsweise wenigen Millisekunden, jede beliebige Wellenlänge eines großen Spektralbereichs einzustellen. Es kann daher unter Verwendung einer einzigen Lichtquelle ein Beleuchtungssystem aufgebaut werden, das für alle oder fast alle Fluoreszenzmeßzwecke geeignet ist.

Entsprechende Vorteile lassen sich aber auch dadurch erreichen, daß entsprechend einer abgewandelten Ausführungsform der Erfindung die Beleuchtungsvorrichtung eine einzige Lichtquelle aufweist und als Beugungsgitter ein planes Reflexionsgitter vorgesehen ist, auf das von der Lichtquelle kommendes Licht über einen Planspiegel auffällt, der zwecks Erzeugung der unterschiedlichen Anregungswellenlängen mittels eines Scanners verstellt wird.

Die Beleuchtungsvorrichtung ist vorzugsweise mit einem einzigen Lichtleiter versehen, dessen Eintrittsöffnung mit Licht von der einzigen Lichtquelle beaufschlagt wird und dessen Austrittsöffnung auf der Eingangsseite des Beugungsgitters liegt. Dabei ist zweckmäßig zwischen der Austrittsöffnung des Lichtleiters und der Eingangsseite des Beugungsgitters ein Parabolspiegel angeordnet.

Die einzige Lichtquelle kann gepulst, beispielsweise als Blitzlampe ausgelegt, sein. Blitzlampen erlauben es, ihre gesamte Lichtennergie in weniger als beispielsweise einer Mikrosekunde freizusetzen. Dadurch kann das Dunkelrauschen eliminiert werden, da in dem kurzen Zeitfenster, während dessen der Detektor offen gehalten werden muß, nur wenige Rauschelektronen akkumulieren können. Weil zudem die Anzahl der Blitze pro Anregungswellenlänge variabel gestaltet werden kann, lassen sich Unterschiede in der Fluoreszenz-Effizienz bequem ausgleichen. Sollte bei einer Anregungswellenlänge z. B. die Fluoreszenz des Untersuchungsobjekts fünfmal geringer sein als bei der anderen verwendeten Anregungswellenlänge, können fünf Blitze der erstgenannten Wellenlänge integriert werden, während bei der anderen Anregungswellenlänge nur einmal geblitzt wird. Bei einer Verhältnismessung, bei welcher die Fluoreszenz bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen ermittelt wird, ist der Quotient der Meßwerte von Zelldicke und Indikatorkonzentration unabhängig und ein direktes Maß für die Ionenkonzentration in dem Untersuchungsobjekt, beispielsweise einer Zellkultur.

Für das Signal/Rausch-Verhältnis einer solchen Verhältnismeldung ist es aber vorteilhaft, wenn beide Meßwerte (d. h. Zähler und Nenner) in etwa gleich groß sind, was auf die vorstehend skizzierte Art und Weise leicht erreicht werden kann. Für die Aufnahme von Bildern mit einer CCD-Kamera ist wegen deren langer Auslesezeit eine stroboskopartige Beleuchtung ebenfalls von Vorteil. Eine solche Beleuchtung stellt sicher, daß während des Ausleseprozesses keine weiteren Photonen akkumuliert werden, die das Bild verschmieren könnten.

Die Beleuchtungsvorrichtung kann aber auch mit einer kontinuierlichen Lichtquelle ausgestattet sein. Bei Verwendung einer kontinuierlichen Lichtquelle kann im Strahlengang zwischen der Lichtquelle und dem Beugungsgitter ein, vorzugsweise elektronisch, ansteuerbarer Verschluß angeordnet sein. Ein solcher mechanischer

scher Verschluß erlaubt eine Belichtungszeitsteuerung wie bei einer Kamera und somit eine flexible Anpassung an variierende Meßgegebenheiten.

Bei der Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach der Erfindung ist aber selbst im Falle einer kontinuierlichen Lichtquelle nicht einmal mehr der Einsatz eines mechanischen Verschlusses notwendig. Vielmehr kann im Betrieb das Beugungsgitter ständig mit von der Lichtquelle abgegebenem Licht beaufschlagt sein, wenn die Ruheposition des Scanners so gewählt ist, daß das Beugungsgitter in der Ruheposition eine für das System unkritische Wellenlänge abgibt. Die Belichtungszeit bei den jeweiligen Anregungswellenlängen läßt sich dabei über die Verweilzeit des Scanners einstellen.

Zwischen der Austrittsseite des Beugungsgitters und einem im Strahlengang zwischen dem Beugungsgitter und dem Untersuchungsobjekt abbildenden System, beispielsweise einem Mikroskop, kann gleichfalls ein Lichtleiter angeordnet sein. Die Lichtleiter können in ihrem Querschnitt genau dem optimalen Lichtdurchsatz des abbildenden Systems (Mikroskops) angepaßt sein. Ein weiterer Vorteil der Lichtleiter liegt in der räumlichen Trennung zwischen der Lichtquelle und dem abbildenden System (Mikroskop). Probleme durch die Wärmeentwicklung der Lampe sowie elektrische Artefakte durch den Zündvorgang bei Verwendung einer gepulsten Lichtquelle werden sicher verhindert. Zur Fokussierung des gebrochenen Lichtes auf dem Austrittslichtleiter wird bevorzugt ebenfalls ein Parabolspiegel eingesetzt. Man kann sich dazu des Parabolspiegels bedienen, der bereits das Licht vom Eintrittslichtleiter auf das Gitter geworfen hat. Im Idealfall müßten dann Eintritts- und Austrittslichtleiter die gleiche Position einnehmen. Dies ist selbstverständlich praktisch undurchführbar. Es wird jedoch dafür gesorgt, daß Eintritts- und Austrittslichtleiter an ihrem gitterseitigen Ende unmittelbar untereinander bzw. nebeneinander liegen. In einem solchen Fall kann mit einem einzigen Spiegel, insbesondere Parabolspiegel, gearbeitet werden.

Sollen Eintritts- und Austrittslichtleiter jedoch deutlich voneinander getrennt sein, benötigt man insgesamt zwei Parabolspiegel, einen für den Eintritt und einen für den Austritt. Dazu ist es dann aber notwendig, daß Einfall- und Ausfallwinkel des vom Gitter gebrochenen parallelen Lichtes unterschiedlich sind.

An die Stelle des Austrittslichtleiters kann auch eine einfache Blende treten, wobei das selektierte Licht direkt in den Auflichtkondensor des Mikroskops eingekoppelt werden kann. Die Blende wird dann direkt in die Objektiv-Pupille abgebildet.

Es versteht sich, daß das beschriebene Gerät auch zur Mikrospektrophotometrie eingesetzt werden kann.

Die Meßvorrichtung kann derart ausgelegt sein, daß die bei mehreren unterschiedlichen Wellenlängen angeregten Fluoreszenzwerte nacheinander bestimmt werden, d. h. die Zuordnung über das Zeitprofil erfolgt, wie dies in der oben genannten DE-Patentanmeldung P 4115 401.0 näher erläutert ist. Bei Fluoreszenzfarbstoffen, mit denen sich beispielsweise die lebende Zelle anfärbten und die räumliche Verteilung von für den Zellmetabolismus wichtigen Ionen (Magnesium, Calcium und Chlorid, vor allem aber Kalzium) registrieren läßt, beträgt die Lebensdauer des für die Fluoreszenzmessung herangezogenen angeregten Zustandes in der Regel nur einige Nanosekunden. Während dieser kurzen Zeit, in der die angeregten Moleküle Photonen aussenden, können die Moleküle ihre Lage und Orientierung nur sehr geringfügig ändern. Ein mit einer definierten Polarisa-

tionsrichtung angeregtes Molekül wird demnach auch polarisiertes Licht emittieren. Dieser Umstand läßt sich bei einer Fluoreszenz-Meßvorrichtung der eingangs genannten Art erfundengemäß dadurch ausnutzen, daß die Meßvorrichtung derart ausgelegt ist, daß das Untersuchungsobjekt mit den beiden unterschiedlichen Anregungswellenlängen gleichzeitig, aber mit unterschiedlicher Polarisationsrichtung angeregt wird. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes erfolgt also gleichzeitig mit zwei Wellenlängen, und zwar bei der einen Wellenlänge mit der einen und bei der anderen Wellenlänge mit der dazu orthogonalen Polarisierung. Trotz der gleichzeitigen Anregung läßt sich bei der Detektion eine genaue Zuordnung treffen, welcher Anteil der Fluoreszenz von der jeweiligen Anregungswellenlänge herrührt. Dazu muß lediglich das emittierte Licht in seine Polarisationskomponenten zerlegt werden, und diese Komponenten müssen getrennt registriert werden.

Die anregungsseitige bichromatische Polarisationsaufspaltung geschieht vorzugsweise unmittelbar vor dem Beugungsgitter mit Hilfe eines polarisierenden Prismas, insbesondere eines Rochon-Prismas oder eines Wollaston-Prismas, welches den ordentlichen und den außerordentlichen Strahl um einen bestimmten, vorgebaren Winkel gegeneinander versetzt. Der Winkelversatz kann so gewählt werden, daß der resultierende unterschiedliche Eintrittswinkel auf dem Beugungsgitter genau den gewünschten Wellenlängenunterschied ergibt.

Zur Registrierung benutzt man bei photometrischen Spotmessungen vorzugsweise einen polarisierenden Strahleiterwürfel mit zwei nachgeschalteten Detektoren. Durch die Möglichkeit, Halbleiterdetektoren einzusetzen zu können, ist dies ohne große Kosten zu realisieren. Die Verhältnisbildung der simultan ermittelten Meßwerte geschieht dann entweder analog (z. B. über logarithmische Verstärker) oder digital, wobei in jedem Fall Schwankungen der Anregungsenergie vollständig eliminiert werden.

Bei zweidimensionalen Aufnahmen mit einer CCD-Kamera müssen entweder zwei Kameras eingesetzt werden, oder man erzeugt mit Hilfe eines zweiten Prismas (insbesondere Rochon-Prismas) zwei nebeneinanderliegende Halbbilder auf einem CCD-Chip.

Bevorzugte Ausführungsbeispiele der Meßvorrichtung nach der Erfindung sind nachstehend unter Bezugnahme auf die Zeichnungen erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 schematisch eine Fluoreszenz-Meßvorrichtung mit scannergesteuertem, in Reflexion betriebenem Volumengitter zur zeitlich versetzten Erzeugung der unterschiedlichen Anregungswellenlängen,

Fig. 2 eine Variante der Meßvorrichtung von Fig. 1, in der nicht das Gitter selber, sondern ein Planspiegel mit Hilfe eines Scanners bewegt wird,

Fig. 3 eine schematische Darstellung eines Teils einer Meßvorrichtung ähnlich Fig. 1, die jedoch für simultane Anregung mit zwei Wellenlängen ausgelegt ist,

Fig. 4 eine Ausführungsform des abbildenden Systems der Meßvorrichtung gemäß Fig. 3 und

Fig. 5 eine abgewandelte Ausführungsform des abbildenden Systems.

Die in Fig. 1 veranschaulichte Fluoreszenz-Meßvorrichtung weist eine gepulste Lichtquelle 1, beispielsweise in Form einer Stroboskop-Blitzlampe, auf, deren Licht über ein zweckentsprechendes, nicht näher dargestelltes abbildendes System (Optik) in eine Lichtleitfaser 2 eingekoppelt wird. Aus dem Austrittsende des Lichtleiters 2 austretendes Licht trifft auf einen Parabolspie-

gel 3, und es wird von diesem auf ein holographisches Volumengitter 4 gerichtet. Das Volumengitter 4 wird bei der veranschaulichten Ausführungsform in Reflexion betrieben. Es ist auf einem Scanner 5 befestigt, dessen Treiberelektronik nicht dargestellt ist. Licht, welches vom Volumengitter unter dem gleichen Winkel wieder zurückgebeugt wird, trifft wieder auf den selben Parabolspiegel 3 und wird von diesem in die Eintrittsöffnung eines austrittsseitigen Lichtleiters 6 fokussiert. Durch entsprechende Ansteuerung des das Volumengitter 4 tragenden Scanners 5 läßt sich das Gitter 4 rasch und genau drehen. Innerhalb weniger Millisekunden kann so jede beliebige Wellenlänge innerhalb eines großen Spektralbereichs eingestellt werden, um sich unterschiedlichen Meßanforderungen, insbesondere unterschiedlichen Indikatorfarbstoffen, anzupassen.

Das aus dem Lichtleiter 6 austretende polychromatische Anregungslicht wird mittels eines abbildenden Systems, zu dem beispielsweise eine Linse 7 gehört, in den Auflichtstrahlengang eines Mikroskops 8 eingekoppelt und mit einem dichroitischen Spiegel 9 in den Mikroskopbus eingespiegelt. Der dichroitische Spiegel 9 reflektiert die beiden Anregungswellenlängen, welche dann von einem Objektiv 10 in einer Objektebene 11 fokussiert werden. Dort regen sie Indikatormoleküle zur Fluoreszenz an. Teile des abgestrahlten Fluoreszenzlichtes werden von dem Objektiv 10 wieder aufgefangen und passieren den dichroitischen Spiegel 9, der so ausgelegt ist, daß die verschiedenen Anregungswellenlängen reflektiert, das von der Probe ausgesandte Fluoreszenzlicht dagegen transmittiert wird. Abgestrahltes Fluoreszenzlicht wird danach von einer Projektionslinse 12 in einer Beobachtungsebene 13 fokussiert, wobei ein vergrößertes Bild des Objekts in der Objektebene 11 erhalten wird. Für Spotmessungen ist in der Beobachtungsebene 13 ein einzelner Detektor, vorzugsweise ein Halbleiterdetektor, für zweidimensionale Messungen beispielsweise eine CCD-Kamera angebracht.

Die Anordnung gemäß Fig. 2 verwendet einen auf dem Scanner 5 montierten, einfachen Planspiegel 14, welcher paralleles Licht (vorzugsweise wieder durch einen Parabolspiegel 3 erzeugt) auf ein gewöhnliches, planes Beugungsgitter 15 treffen läßt. Bei dem Beugungsgitter 15 kann es sich auch um ein Volumengitter handeln. Durch die Winkelbewegung des Scanners 5 wird der parallele Strahl an verschiedene Stellen des Gitters 15 gelenkt, wobei der Einfallswinkel variiert wird. Nur das Licht, das unter einem mit dem Einfallswinkel übereinstimmenden Austrittswinkel zurückgebeugt wird, gelangt über den Planspiegel 14 und beispielsweise die Parabolspiegel-Anordnung wieder auf den Austrittslichtleiter 6 und steht damit als Anregungslicht zur Verfügung. Die Wellenlänge des Anregungslichtes ist wie bei der Ausführungsform der Fig. 1 durch den Drehwinkel des Scanners 5 vorgegeben.

Die Anordnung gemäß Fig. 3 eignet sich zur Simultananregung mit zwei Wellenlängen unter Verwendung von polarisiertem Licht. Dabei ist zur anregungsseitigen bichromatischen Polarisationsaufspaltung im Strahlengang unmittelbar vor dem Volumengitter 4 ein Rochon- oder Wollaston-Prisma 16 angeordnet, welches den ordentlichen Strahl 17 und den außerordentlichen Strahl 18 um einen bestimmten, vorgebbaren Winkel gegenüber einander versetzt, wie dies in Fig. 3 angedeutet ist. Der Winkelversatz kann so gewählt werden, daß der resultierende unterschiedliche Eintrittswinkel auf dem Beugungsgitter 4 genau den gewünschten Unterschied der

Anregungswellenlängen ergibt.

Zur Registrierung ist bei photometrischen Spotmessungen gemäß Fig. 4 vorzugsweise ein polarisierender Strahlteilerwürfel 19 vorgesehen, dem zwei Detektoren 20 und 21 nachgeschaltet sind. Bei den Detektoren 20 und 21 handelt es sich zweckmäßig um Halbleiterdetektoren. Das Verhältnis der simultan ermittelten Meßwerte kann, beispielsweise über logarithmische Verstärker, analog gebildet werden. Die Meßwertverarbeitung kann aber auch digital geschehen. In jedem Fall werden Schwankungen der Anregungsenergie vollständig eliminiert.

Fig. 5 zeigt eine abgewandelte Ausführungsform, bei der im Strahlengang zwischen dem Objektiv 10 und der Tubuslinse 12 ein weiteres Rochon- oder Wollaston-Prisma 22 sitzt, mit dessen Hilfe in der angedeuteten Weise zwei nebeneinanderliegende Halbbilder auf ein und den selben CCD-Chip erzeugt werden, wobei eine Hälfte 23 für das aus ordentlichem Licht zusammengesetzte Bild, und die zweite Hälfte 24 für das "außerordentliche Bild" benutzt wird.

Bei manchen Farbstoffen besteht die Möglichkeit einer Verhältnisbildung, indem bei nur einer selektierten Wellenlänge angeregt und bei zwei Wellenlängen die Fluoreszenz bestimmt wird. Dazu lassen sich die gezeigten Anordnungen auch verwenden, indem man den Polwürfel im Mikroskop durch einen dichroitischen Teilespiegel ersetzt, der das emittierte Licht in die beiden gewünschten Wellenlängen aufspaltet.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Apparatur besteht darin, während der Messung für kurze Zeit mit UV-Licht anzuregen (ca. 360 nm) und damit die Photolyse einer sogenannten "caged compound" auszulösen. Diese Verbindungen setzen durch einen Lichtblitz Ionen (z. B. Calcium) oder zellaktive Substanzen wie ATP oder cyklische Nucleotide frei und ermöglichen es so, zellinterne Regelprozesse gezielt und stoßförmig anzuregen. Danach kann dann wieder mit dem üblichen Meßprotokoll die eigentliche Messung fortgesetzt und die Wirkung der freigesetzten Substanz verfolgt werden.

#### Patentansprüche

1. Fluoreszenz-Meßvorrichtung zum Bestimmen von Ionenkonzentrationen in einem Untersuchungsobjekt, mit einer Beleuchtungsvorrichtung, einem Beugungsgitter, das so beleuchtet wird, daß es Licht mit mehreren unterschiedlichen, vorwählbaren Anregungswellenlängen entweder in kurzem zeitlichem Abstand oder gleichzeitig auf das Untersuchungsobjekt auftreffen läßt, das mit einem oder mehreren Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt ist, deren Absorptions- und somit Fluoreszenzeigenschaften sich in Abhängigkeit von der zu bestimmenden Ionenkonzentration ändern, und mit einer Detektoreinheit, welche das resultierende Fluoreszenzlicht in ein Meßsignal umwandelt, dadurch gekennzeichnet, daß die Beleuchtungsvorrichtung eine einzige Lichtquelle (1) aufweist und als Beugungsgitter ein holographisches Volumengitter (4) vorgesehen ist, das zwecks Erzeugung der unterschiedlichen Anregungswellenlängen mittels eines Scanners (5) verstellt wird.

2. Fluoreszenz-Meßvorrichtung zum Bestimmen von Ionenkonzentrationen in einem Untersuchungsobjekt, mit einer Beleuchtungsvorrichtung, einem Beugungsgitter, das so beleuchtet wird, daß

es Licht mit mehreren unterschiedlichen, vorwählbaren Anregungswellenlängen entweder in kurzem zeitlichem Abstand oder gleichzeitig auf das Untersuchungsobjekt auftreffen läßt, das mit einem oder mehreren Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt ist, deren Absorptions- und somit Fluoreszenzeigenschaften sich in Abhängigkeit von der zu bestimmenden Ionenkonzentration ändern, und mit einer Detektoreinheit, welche das resultierende Fluoreszenzlicht in ein Meßsignal umwandelt, dadurch gekennzeichnet, daß die Beleuchtungsvorrichtung eine einzige Lichtquelle (1) aufweist und als Beugungsgitter ein planes Reflexionsgitter (15) vorgesehen ist, auf das von der Lichtquelle (1) kommendes Licht über einen Planspiegel (14) auffällt, der zwecks Erzeugung der unterschiedlichen Anregungswellenlängen mittels eines Scanners (5) versteht wird.

3. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Beleuchtungsvorrichtung ferner mit einem einzigen Lichtleiter (2) versehen ist, dessen Eintrittsöffnung mit Licht von der einzigen Lichtquelle (1) beaufschlagt wird und dessen Austrittsöffnung auf der Eingangsseite des Beugungsgitters (4, 15) liegt.

4. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der Austrittsöffnung des Lichtleiters (2) und der Eingangsseite des Beugungsgitters (4, 15) ein Parabolspiegel (3) angeordnet ist.

5. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach einem der Ansprüche 1, 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Volumengitter (4) als Reflexionsgitter betrieben ist.

6. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle (1) gepulst ist.

7. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Lichtquelle (1) eine Blitzlampe vorgesehen ist.

8. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine kontinuierliche Lichtquelle vorgesehen ist.

9. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß im Strahlengang zwischen der kontinuierlichen Lichtquelle und dem Beugungsgitter (4, 15) ein ansteuerbarer Verschluß angeordnet ist.

10. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß im Betrieb das Beugungsgitter (4, 15) ständig mit von der Lichtquelle abgegebenem Licht beaufschlagt ist und die Ruheposition des Scanners (5) so gewählt ist, daß das Beugungsgitter in dieser Ruheposition eine für das System unkritische Wellenlänge abgibt.

11. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Belichtungszeit bei den jeweiligen Anregungswellenlängen über die Verweilzeit des Scanners (5) einstellbar ist.

12. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der Austrittsseite des Beugungsgitters (4, 15) und einem im Strahlengang zwischen dem Beugungsgitter und dem Untersuchungsobjekt liegenden abbildenden System (7, 8) gleichfalls ein Lichtleiter (6) angeordnet ist.

13. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach Anspruch 12, gekennzeichnet durch einen Parabolspiegel (3)

zum Fokussieren des aus dem Beugungsgitter (4, 15) austretenden Lichts in der Eintrittsöffnung des austrittsseitigen Lichtleiters (6).

14. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach einem der Ansprüche 12 und 13, dadurch gekennzeichnet, daß das abbildende System ein Mikroskop (8) aufweist.

15. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11 und Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der Austrittsseite des Beugungsgitters (4) und einem Auflichtkondensator des Mikroskops (8) eine Blende sitzt, die direkt in die Objektiv-Pupille des Mikroskops abgebildet wird.

16. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Meßvorrichtung derart ausgelegt ist, daß die bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen angeregten Fluoreszenzwerte nacheinander bestimmt werden.

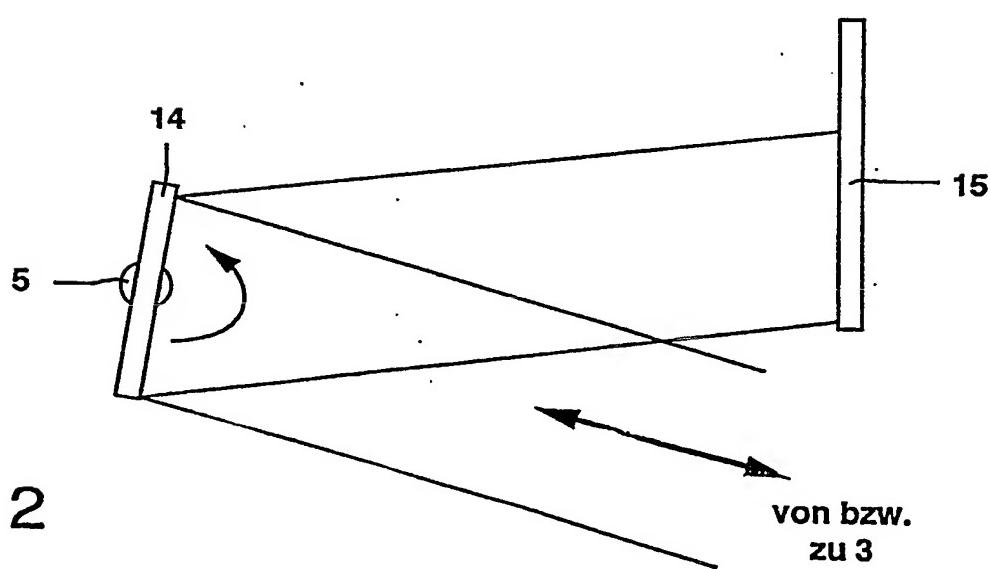
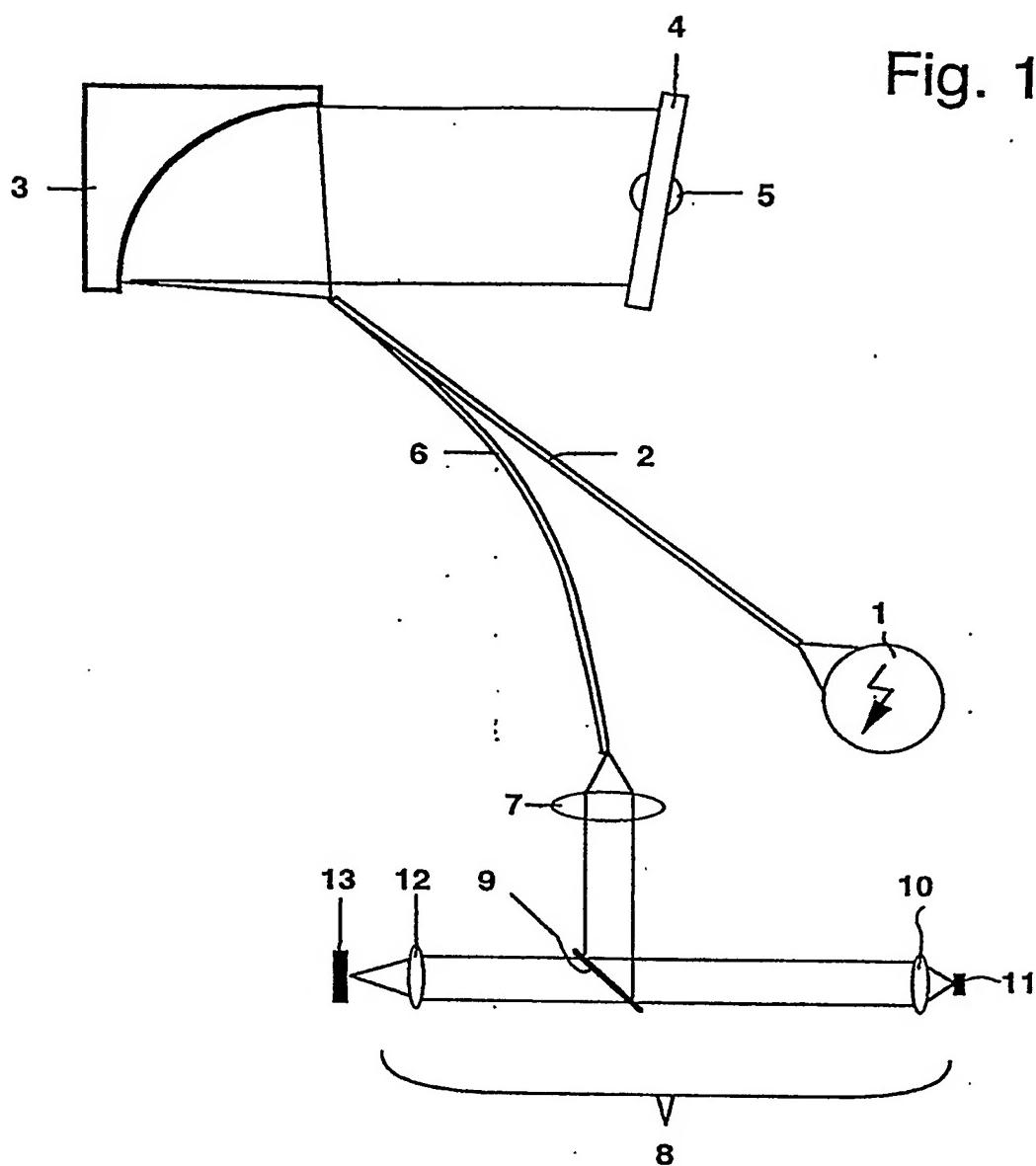
17. Fluoreszenz-Meßvorrichtung zum Bestimmen von Ionenkonzentrationen in einem Untersuchungsobjekt, mit einer Beleuchtungsvorrichtung, einem Beugungsgitter, das so beleuchtet wird, daß es Licht mit zwei unterschiedlichen Anregungswellenlängen abgibt, mit einem abbildenden System, welches das Licht mit den unterschiedlichen Anregungswellenlängen auf das Untersuchungsobjekt auftreffen läßt, das mit mindestens einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt ist, dessen Absorptions- und somit Fluoreszenzeigenschaften sich in Abhängigkeit von der zu bestimmenden Ionenkonzentration ändern, und mit einer Detektoreinheit, welche das resultierende Fluoreszenzlicht in ein Meßsignal umwandelt, insbesondere nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Meßvorrichtung derart ausgelegt ist, daß das Untersuchungsobjekt mit den beiden unterschiedlichen Wellenlängen gleichzeitig, aber mit unterschiedlicher Polarisationsrichtung angeregt wird.

18. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß unmittelbar vor dem Beugungsgitter (4) ein Prisma (16) angeordnet ist, welches ausgangsseitig den ordentlichen und den außerordentlichen Strahl (17 bzw. 18) um einen vorbestimmten Winkel gegeneinander versetzt, wobei der Winkelversatz so gewählt ist, daß die resultierenden unterschiedlichen Eintrittswinkel der Strahlen auf dem Beugungsgitter den gewünschten Wellenlängenunterschied bewirken.

19. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß das abbildende System mit einem polarisierenden Strahlteiler (19) versehen ist, dem zwei Detektoren (20, 21) nachgeschaltet sind.

20. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß im Strahlengang des abbildenden Systems ein Prisma (22) liegt, das für die beiden unterschiedlichen Wellenlängen zwei nebeneinanderliegende Halbbilder zeugt.

21. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach Anspruch 20, gekennzeichnet durch einen CCD-Chip (23, 24), auf dem die beiden Halbbilder erzeugt werden.



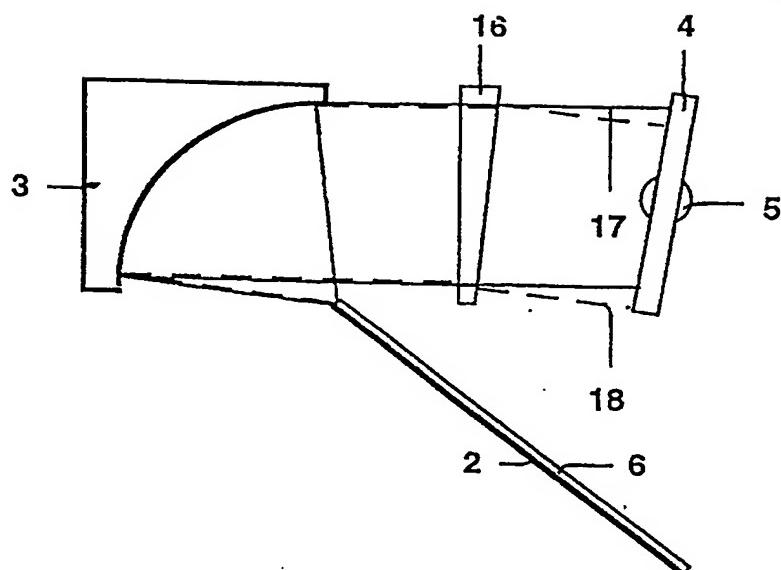


Fig. 3

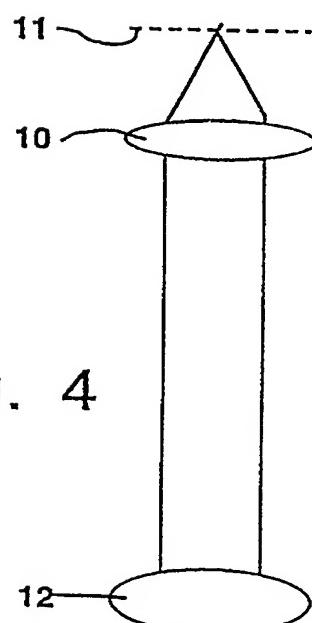


Fig. 4

